

酶法制备大米抗氧化肽的蛋白酶筛选*

马海乐¹ 刘斌² 李树君^{1,2} 贾俊强¹ 田万敏¹

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013; 2. 中国农业机械化科学研究院, 北京 100083)

【摘要】 通过酶法制备进行大米抗氧化肽蛋白酶的筛选。以大米蛋白为原料、酶解液对 DPPH 自由基清除率为指标,从风味蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、复合蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胃蛋白酶等 7 种蛋白酶中,筛选出中性蛋白酶为最佳用酶。通过试验得出最佳的酶解反应条件为:底物质量浓度 1.0 g/(100 mL)、加酶量 8%、pH 值 6.0、温度 60℃、酶解时间 30 min。酶解液稀释 15 倍对 DPPH 自由基的清除率为 89.45%,酶解液清除 DPPH 自由基的 EC₅₀ 值为 0.217 g/(100 mL)。

关键词: 大米蛋白 抗氧化肽 蛋白酶筛选 DPPH 自由基清除率 正交试验
中图分类号: TS210.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2010)11-0119-05

Enzymatic Preparation of Rice Anti-oxidation Peptide

Ma Haile¹ Liu Bin² Li Shujun^{1,2} Jia Junqiang¹ Tian Wanmin¹

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China
2. Chinese Academy of Agricultural Mechanization Sciences, Beijing 100083, China)

Abstract

Protease screening was employed to prepare rice anti-oxidation peptide with enzymolysis method. Scavenging rate of hydrolysate to the DPPH radical was used as an index with rice protein as the raw material. Neutral protease was screened out from the following seven kinds of protease. These kinds of protease were flavor protease, neutral protease, trypsin, complex protease, alkaline protease, papain and pepsin respectively. The optimum hydrolysis conditions obtained from the experiments were as the following: concentration of substrate was 1.0 g/(100 mL), ratios of enzyme-substrate was 8%, pH value 6.0, 60℃ and 30 min of reaction time. After being diluted 15 times, scavenging rate of hydrolysate liquid to the DPPH radical 89.45% could be obtained and EC₅₀ value of hydrolysate scavenging DPPH radical was 0.217 g/(100 mL).

Key words Rice protein, Anti-oxidation peptide, Protease screening, Scavenging rate of DPPH radical, Orthogonal test

引言

大米蛋白中不仅不含抗营养因子,而且还具有低过敏性、无异味、消化率高等优点。米糟作为大米加工后的副产品,其蛋白质含量一般在 40%~50% (干基),但目前主要用作动物饲料,其价值远未得到充分利用^[1]。如果能进一步综合利用,将会收到

可观的经济、社会效益。
生物活性肽由于功能性好、易被人体吸收利用、安全性高和生产成本低等优点而具有很好的市场前景^[2~3]。利用大米蛋白生产具有特殊功能的生物活性肽,应是提高其附加值和扩大应用范围的途径之一。
酶解法生产活性肽不仅具有其他方法无法比拟

收稿日期: 2010-01-08 修回日期: 2010-03-06
* “十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAD27B06)、科技部国际合作项目(2009DFA32000)和江苏省 2008 普通高校研究生科研创新计划资助项目(CX08B-149Z)
作者简介: 马海乐,教授,博士生导师,主要从事食源性多肽的制备及功能评价研究, E-mail: mhl@ujs.edu.cn.

的安全、高效等优势,而且也是目前研究的热点^[4]。不同的蛋白酶会作用肽键不同的位点,通过水解得到不同特性的肽类,同时试验条件的差异也会对酶解反应产物产生重要的影响。因此,选择合适的酶是保证制备高活性抗氧化肽的关键。

本文以米糟为底物,选用 7 种商业蛋白酶对大米蛋白进行酶解,以酶解液对 DPPH 自由基清除率为试验控制指标,经过初选及优化复选得到最佳使用酶并确定其最优工艺参数。

表 1 试验用蛋白酶的酶活及作用条件
Tab. 1 Activities and action conditions of several protein enzymes

酶的种类	最适作用条件		酶液稀释倍数	酶活力/万 U·g ⁻¹	特异性
	pH 值	温度/℃			
风味蛋白酶	6.0	50	10 000	5.65	作用范围广
中性蛋白酶	7.0	60	1 250	1.56	作用范围广
胰蛋白酶	8.0	50	2 500	0.77	作用范围广
复合蛋白酶	6.5	50	30 000	10.28	Lys-, Arg-COOH
碱性蛋白酶	9.0	50	10 000	10.36	作用范围广
木瓜蛋白酶	6.0	60	5 000	5.18	Arg-, Lys-, Phe-X-COOH
胃蛋白酶	1.8	37	5 000	1.39	作用范围广

1.2 主要仪器与设备

SHZ-88A 型往复式水浴恒温振荡器,太仓市实验设备厂;WFJ 7200 型可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;PHS-3C 型精密 pH 计,上海精密科学仪器有限公司;79-3 型恒温磁力搅拌器,上海司乐仪器厂;LD5-2A 型离心机,北京医用离心机厂;Sartorius 万分之一电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.3 试验方法

蛋白酶的初选试验:在相同底物质量浓度、加酶量、酶解时间,以及每种酶推荐温度和 pH 值下进行酶解,初步筛选优势蛋白酶。称取 5 g 大米蛋白,加一定量蒸馏水配成底物质量浓度为 5 g/(100 mL)的蛋白液,于恒温水浴锅中加热至推荐作用的最适温度,调节料液至推荐 pH 值后,按加酶量 5% 加入一定量的蛋白酶,保温水解 2 h,酶解结束后,沸水浴灭酶 10 min,然后在 3 500 r/min 下离心 10 min,取上清液,并将其稀释 5 倍后,测定酶解液对 DPPH 自由基清除率。

蛋白酶的复选试验:对初步筛选出的几种优势蛋白酶,通过单因素和正交试验,在各自最优酶解效果下,比较筛选出最佳用酶。首先是单因素试验,其工艺流程为:一定底物质量浓度大米蛋白液(料液体积选择 100 mL)→调节 pH 值、温度至酶最适值→加酶→选择不同的酶解时间→灭酶(100℃,10 min)→

1 材料与方法

1.1 材料

大米蛋白(饲料级),嘉吉饲料镇江有限公司(含蛋白质 66.8%,脂肪 4.5%,水分 6.9%,灰分 3.1%);1,1-二苯基-2-苦基苯基(DPPH),Sigma 公司;无水乙醇,国药集团化学试剂有限公司,其他化学试剂均为国产分析纯。7 种商业蛋白酶的性能见表 1。

离心(3 500 r/min,10 min)→收集上清液→将上清液稀释到 5 倍后测定 DPPH 自由基清除率,同时测定酶解液的水解度;然后分别进行正交优化试验,以酶解液对 DPPH 自由基的清除率为指标确定各自酶的最佳反应条件,并确定在此基础下的最佳酶解时间和大米抗氧化肽的 EC₅₀值(表示清除自由基能力达 50% 时的底物质量浓度),通过比较确定最佳用酶。

1.4 水解度(DH)和 DPPH 自由基清除率的测定

1.4.1 蛋白质水解度的测定

水解度(degree of hydrolysis,简称 DH)是指蛋白质水解过程中被裂解的肽键数与给定蛋白质的总肽键数间的比值。采用甲醛滴定法测定水解度^[5],计算公式为

$$D_H = \frac{5.93 W_1}{W_2} \times 100\%$$

式中 W₁——水解液中酶解出的游离氨基氮的质量浓度, g/mL

W₂——底物质量浓度, g/mL

1.4.2 清除 DPPH 自由基的测定

取 2 mL 待测样品于试管中,再加入 2 mL 质量浓度为 0.04 g/L 的 DPPH 无水乙醇溶液,混合均匀,反应 20 min,3 500 r/min 离心分离 10 min,取上清液在 517 nm 处测其吸光度 A_i;另取 2 mL 待测样品于试管中,分别加入无水乙醇 2 mL,反应 20 min,

3 500 r/min离心分离 10 min, 取上清液在 517 nm 处测其吸光度 A_j ; 以 2 mL 0.04 g/L DPPH 无水乙醇溶液和 2 mL 无水乙醇反应作为参比, 其吸光度记为 A_0 。待测样品对 DPPH 自由基的清除率计算公式^[6]为

$$E_{DPPH} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶的初选试验

7 种蛋白酶的初选试验结果如表 2 所示。表 2 表明, 大米蛋白经 7 种商业蛋白酶酶解所得的水解液对 DPPH 自由基均有一定的抑制作用, 其中风味蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶表现较优, 酶解液对 DPPH 自由基的清除率在 50% 左右, 大米抗氧化肽的 EC_{50} 值都较低, 但存在较大差异。

表 2 各酶解液的 DPPH 自由基清除率和 EC_{50} 值
Tab.2 DPPH free radical scavenging effect of hydrolysate

酶的种类	抗氧化性能	
	DPPH 自由基清除率/%	EC_{50} 值 /g·(100 mL) ⁻¹
风味蛋白酶	49.225	0.832
中性蛋白酶	52.666	0.985
胰蛋白酶	22.293	1.532
复合蛋白酶	38.602	1.124
碱性蛋白酶	41.445	1.432
木瓜蛋白酶	51.021	0.753
胃蛋白酶	29.774	0.998

由于酶自身特异性导致对蛋白底物的作用位点存在较大区别, 使得各自水解得到的短肽在数量及清除活性能力方面都存在较大不同, 为进一步筛选出优良的水解用酶, 比较不同蛋白酶在各自最优条件下的酶解效果就更有意义。依据结果, 选出 3 种表现较优的蛋白酶做进一步的复选试验。

2.2 3 种优势蛋白酶的进一步筛选

2.2.1 单因素试验

对 3 种效果较优的蛋白酶进一步考察底物质量浓度、加酶量、酶解温度及 pH 值对酶解效果的影响, 酶解时间均为 2 h。

(1) 底物质量浓度

3 种酶在加酶量 5% 及各自推荐的 pH 值、温度(表 1)条件下, 考察底物质量浓度对酶解液水解度和 DPPH 自由基清除率的影响, 结果如图 1 所示。

由图 1 可以看出, 随着底物质量浓度的增大, 水解度和对 DPPH 自由基的清除率都呈现出较明显的

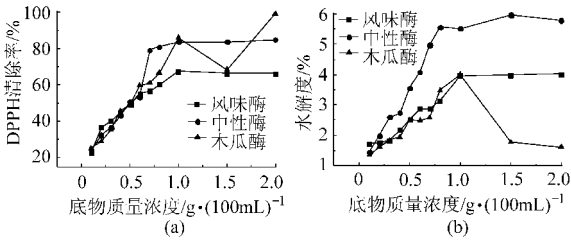


图 1 底物质量浓度对酶解液 DPPH 自由基清除率和水解度的影响

Fig.1 Influence of protein concentration on DPPH free radical scavenging effect and DH of hydrolyte

上升趋势, 但在底物质量浓度为 1.0 g/(100 mL) 左右时两者的增长趋势都变得平缓甚至出现下降。在浓度水平较低时, 底物质量浓度的加大可以增大与酶的结合促使反应维持在较高速率, 同时可以将反应平衡尽量推向产物的方向, 使得水解度和对 DPPH 自由基清除率同时增加; 但随着底物质量浓度的继续加大, 反应料液的黏度逐渐增加, 影响到酶与底物间的接触和有效反应^[7]。因此水解度和对 DPPH 自由基清除率在增长到一定程度后趋势变缓, 这与薛照辉^[8]所揭示的现象相吻合, 在本试验中还出现水解度下降的变化。

(2) 加酶量

3 种酶在底物质量浓度为 5% 及各自推荐的 pH 值和温度条件下, 考察加酶量对酶解液水解度和 DPPH 自由基清除率的影响, 结果如图 2 所示。

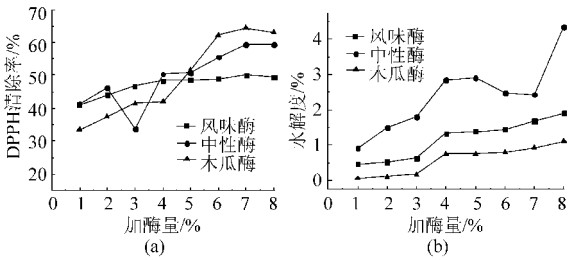


图 2 加酶量对酶解液水解度和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.2 Influence of enzyme concentration on DPPH free radical scavenging effect and DH of hydrolyte

由图 2 可以看出, 随着加酶量的增大, 酶解液的水解度和对 DPPH 自由基的清除率都呈上升趋势, 但当加酶量增至 4% 时, 水解度的增加变得比较平缓; 当加酶量超过 7% 后, 酶解液对 DPPH 自由基的清除率缓慢下降。酶浓度越大, 底物蛋白水解越充分, 生成的小肽量越多, DH 自然随之上升^[9]; 当酶浓度大到一定值后, 逐渐表现出底物不足的现象, 引起 DH 上升缓慢, 但大分子的多肽还可以被进一步降解成具有清除自由基能力的小分子多肽; 当酶浓度进一步增加, 就会出现自由基清除肽被降解, 其清除率开始下降。

(3) pH 值

3 种酶在底物质量浓度与加酶量均为 5% 及各自推荐的温度条件下,考察酶解 pH 值对酶解液水解度和 DPPH 自由基清除率的影响,结果如图 3 所示。

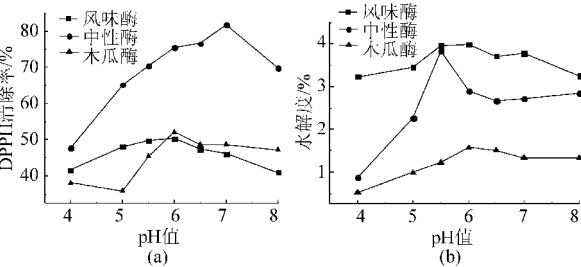


图 3 酶解 pH 值对酶解液水解度和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.3 Influence of hydrolysis pH on DPPH free radical scavenging effect and DH of hydrolyte

由图 3 可以看出,风味蛋白酶和木瓜蛋白酶都在其推荐的 pH 值 6.0 处,水解度和自由基清除率达到最大。对于中性酶,在其推荐的 pH 值 7.0 处自由基清除率最高;而在 pH 值 5.5 处,水解度最高。中性酶没有在推荐的 pH 值下催化酶解反应使得水解度达到最高,尚无恰当的解释。

(4) 温度

3 种酶在底物质量浓度与加酶量均为 5% 及各自推荐的 pH 值条件下,考察温度对酶解液水解度和 DPPH 自由基清除率的影响,结果如图 4 所示。

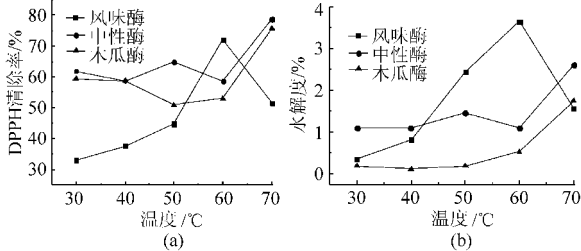


图 4 温度对酶解液水解度和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.4 Influence of hydrolysis temperature on DPPH free radical and DH of hydrolyte

由图 4 可以看出,风味蛋白酶在 60℃、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶在 70℃时,水解度和自由基清除率达到一个较高的值,3 种酶的最佳工作温度均比推荐温度高出 10℃,没有出现在蛋白酶的推荐值意味着酶的活性未处于最佳状态,说明抗氧化肽的分子可能较大^[10],不需要过多的降解。

2.2.2 正交试验结果与分析

依据单因素试验选取底物质量浓度、加酶量、pH 值及温度进行四因素四水平正交试验,以上清液稀释 10 倍测定其 DPPH 的清除率为检测指标,水平

设计见表 2。

表 2 正交试验水平设计

Tab.2 Orthogonal experimental scheme

水平	因素			
	底物质量浓度	加酶量	pH 值	温度
	A/g·(100 mL) ⁻¹	B/%	C	D/℃
1	0.7	5	5	50
2	0.8	6	6	60
3	0.9	7	7	70
4	1.0	8	8	80

试验结果如表 3 所示,利用正交试验设计助手软件分析,得到风味蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶最优酶解条件组合分别为 $A_4B_4C_1D_2$ 、 $A_4B_4C_2D_2$ 和 $A_4B_1C_2D_2$,即风味蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶在底物质量浓度均为 1.0 g/(100 mL),加酶量分别为 8%、8%、5%,酶解 pH 值分别为 5、6、6,酶解温度均在 60℃时酶解液对 DPPH 自由基清除率最大。

表 3 $L_{16}(4^4)$ 正交试验结果

Tab.3 Results of $L_{16}(4^4)$ orthogonal experiment

试验 序号	A	B	C	D	DPPH 清除率/%		
					风味 蛋白酶	中性 蛋白酶	木瓜 蛋白酶
1	1	1	1	1	40.00	53.03	30.83
2	1	2	2	2	41.35	67.87	36.48
3	1	3	3	3	38.20	42.25	26.92
4	1	4	4	4	44.05	55.06	33.79
5	2	1	2	3	43.15	64.05	37.56
6	2	2	1	4	45.39	53.26	31.90
7	2	3	4	1	39.78	72.14	23.42
8	2	4	3	2	45.39	84.94	37.96
9	3	1	3	4	37.53	53.26	42.54
10	3	2	4	3	50.34	54.83	29.61
11	3	3	1	2	52.81	82.25	32.17
12	3	4	2	1	36.40	69.66	35.40
13	4	1	4	2	64.27	88.76	53.84
14	4	2	3	1	45.39	79.55	36.34
15	4	3	2	4	51.01	78.65	51.29
16	4	4	1	3	68.99	74.83	50.75

但最优组合并未出现在正交表中,需要对最优组合进行验证试验。采用优化工艺参数对大米蛋白进行酶解反应 3 次,所得酶解液稀释 10 倍测得其对 DPPH 自由基清除率的依次为 69.8% ± 0.4%、

89.1% ± 0.9% 和 54.5% ± 0.6% ,表明试验重现性较好。通过正交试验确认中性酶酶解效果最好。

2.2.3 最优条件下酶解时间及 EC₅₀ 值的确定

由最优条件下酶解时间对清除率影响的图 5 可以看出,中性蛋白酶酶解液对 DPPH 自由基的清除率在 30 min 达到最大值,为 89.45% (稀释 15 倍)。随着酶解时间的延长,活性肽进一步被降解,引起清除率下降^[10]。

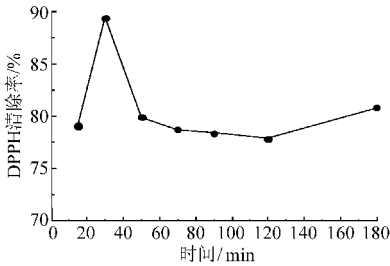


图 5 酶解时间对 DPPH 自由基清除率的影响
Fig. 5 Influence of hydrolysis time on DPPH free radical scavenging effect

采用中性蛋白酶在最佳酶解工艺条件下酶解大米蛋白,对酶解液固形物浓度与清除率之间试验数值关系进行方程回归,由图 6 可以得到酶解物的 EC₅₀ 值为 0.217 g/(100 mL)。

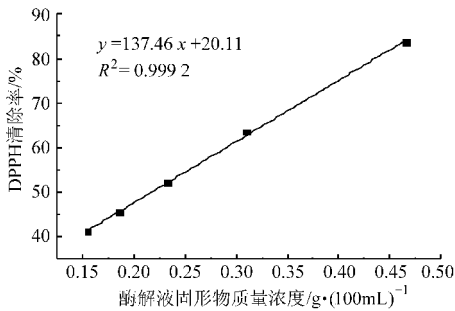


图 6 酶解时间对 DPPH 自由基清除率的影响
Fig. 6 Influence of hydrolysis time on DPPH free radical scavenging effect

3 结论

- (1) 筛选试验结果表明,中性蛋白酶是风味蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、复合蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胃蛋白酶等 7 种蛋白酶中,最佳的酶解大米蛋白制备抗氧化肽的蛋白酶。
- (2) 酶解反应的最佳条件为:底物质量浓度 1.0 g/(100 mL)、加酶量 8%、pH 值 6.0、温度 60℃、酶解时间 30 min,酶解液稀释 15 倍后,对 DPPH 自由基的清除率为 89.45%,酶解液清除 DPPH 自由基的 EC₅₀ 值为 0.217 g/(100 mL)。

参 考 文 献

1 王莉,陈正行,张潇艳. 微波辅助提取米糠多糖的工艺[J]. 江苏大学学报:自然科学版,2007, 28(3): 193 ~ 196.
Wang Li, Chen Zhengxing, Zhang Xiaoyan. Microwave-assisted technology for extracting rice bran polysaccharide[J]. Journal of Jiangsu University: Natural Science Edition, 2007, 28 (3): 193 ~ 196. (in Chinese)

2 Elliot R, Ong T J. Science, medicine and the future: nutritional genomics[J]. British Medical Journal, 2002,324: 1 438 ~ 1 442.

3 Zhu Kexue, Zhou Huiming, Qian Haifeng. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(6): 1 296 ~ 1 302.

4 何荣海,马海乐,周存山,等. 超声波在酶法生产紫菜降血压肽过程中的应用[J]. 江苏大学学报:自然科学版,2007, 28(1): 4 ~ 7.
He Ronghai, Ma Haile, Zhou Cunshan, et al. Application of ultrasound technology to enzyme hydrolysis process in producing antihypertensive peptides from *porphyra yezoensis*[J]. Journal of Jiangsu University: Natural Science Edition, 2007, 28(1): 4 ~ 7. (in Chinese)

5 Ali Bougategf, Mohamed Hajji, Rafik Balti, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases[J]. Food Chemistry, 2009,114 (4): 1 198 ~ 1 205.

6 Amarowicz R, Naczek M, Shahidi F. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000,48(7): 2 755 ~ 2 759.

7 胡筱波,徐明刚,刘志伟,等. 响应面法优化油菜花粉谷蛋白酶解条件[J]. 食品科学,2007,28(7): 117 ~ 121.
Hu Xiaobo, Xu Minggang, Liu Zhiwei, et al. Optimizing conditions for enzymolysis of crude peptide from rape pollen by response surface methodology[J]. Food Science, 2007, 28 (7): 117 ~ 121. (in Chinese)

8 薛照辉. 菜籽肽的制备及其生物活性的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2004:42 ~ 48.

9 丁青芝,骆琳,张连波,等. 酶法制备米糠蛋白 ACEI 活性肽[J]. 粮油加工,2008(2): 5 ~ 8.

10 林琳. 鱼皮胶原蛋白的制备及胶原蛋白多肽活性的研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2007:52 ~ 65.